

LC-MS/MS 测定人血浆中甲磺司特含量的方法开发及验证

杨再香¹, 谭何新¹, 严紫薇¹, 张宗平^{1*}, 肖玉梅²(1.重庆柳江医药科技有限公司, 重庆 401338; 2.植恩生物技术股份有限公司, 重庆 400039)

摘要: 目的 建立可靠的全血采集及生物分析方法,用于甲磺司特(suplatast tosilate, ST)颗粒的生物等效性研究。方法 冰浴条件下,将全血采集到含有 NaF/EDTA 抗凝剂的采血管中,分离的血浆分成 2 份至采血管中,分别加入体积比为 0.5% 的甲酸。20 μL 血浆样品经蛋白沉淀处理后上样,以 ST-D5 为内标。采用正相硅胶分离体系,色谱柱为 Agilent Polaris 3 Si-A(3.0 mm \times 100 mm, 3 μm),流动相为 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液和甲醇-乙腈溶液(1:1),流速 0.80 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,以 50% 有机相进行等度洗脱。在电喷雾电离源正离子模式下检测,ST 和 ST-D5 离子通道(m/z)分别为 328.1 \rightarrow 266.3, 333.1 \rightarrow 271.3。结果 定量范围为 1~200 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$,线性关系良好($r=0.999\ 8$);ST 与 TS-D5 提取回收率均在 105.0%~117.1%;批内和批间准确度分别为 95.67%~108.00%(精密度 $\leq 9.10\%$)和 99.10%~105.00%(精密度 $\leq 7.66\%$)。ST 在全血、血浆中的稳定性符合要求。结论 所建方法稳定、准确、重复性好,且所需样本体积少,满足 ST 颗粒生物等效性研究的需求。

关键词: 甲磺司特; LC-MS/MS; 稳定性; 生物等效性

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)09-1197-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.09.011

引用本文: 杨再香, 谭何新, 严紫薇, 等. LC-MS/MS 测定人血浆中甲磺司特含量的方法开发及验证[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(9): 1197-1202.

Bioanalytical Method Development and Validation for Determination of Suplatast Tosilate in Human Plasma by LC-MS/MS

YANG Zaixiang¹, TAN Hexin¹, YAN Ziwei¹, ZHANG Zongping^{1*}, XIAO Yumei²(1.Chongqing Liujiang Pharma Tech Co., Ltd., Chongqing 401338, China; 2.Zhi'en Biotechnology Co., Ltd., Chongqing 400039, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reliable method for whole blood collection and bioanalysis method for the bioequivalence study of suplatast tosilate(ST) granules. **METHODS** Blood was collected into heparin tubes containing NaF/EDTA under ice bath conditions. After processing, the separated plasma was split into 2 aliquots into each heparin tube containing 0.5% formic acid. Plasma sample(20 μL) was pre-treated by protein precipitation, and ST-D5 was used as the internal standard. Chromatographic separation was achieved through a normal phase silica column[Agilent Polaris 3 Si-A column(3.0 mm \times 100 mm, 3 μm)], the mobile phases was 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution and methanol-acetonitrile(1:1). The flow rate was 0.80 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, the organic proportion was 50% with isocratic elution. Then with the mass spectrometer operated in positive electrospray ionization mode using multiple reaction monitoring, ST and ST-D5 were quantitative analyzed by detecting the ion transitions of m/z 328.1 \rightarrow 266.3, 333.1 \rightarrow 271.3. **RESULTS** The method showed linearity over the concentration range of 1~200 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ was good($r=0.999\ 8$). The extraction recoveries of ST and ST-D5 were between 105.0%~117.1%. Intra- and inter-day accuracy were in the ranges of 95.67%~108.00%(precision $\leq 9.10\%$) and 99.10%~105.00%(precision $\leq 7.66\%$), respectively. Stability of ST in whole blood and plasma were acceptable. **CONCLUSION** The established method is stable, accurate, and reproducible for ST with small sample volume, and meets the requirements of bioequivalence studies of ST granules.

KEYWORDS: suplatast tosilate; LC-MS/MS; stability; bioequivalence

甲磺司特(suplatast tosilate, ST)颗粒是 1995 年日本大鹏药品工业株式会社研制的新型抗过敏药,通过抑制 T 细胞诱导的白细胞介素-4 和白细胞介素-5 的产生,抑制酸性粒细胞的浸润和抑制 IgE 抗体产生,从而发挥抗过敏作用^[1-2]。ST 颗粒被分类为“T 细胞上的 H2 受体阻断药”,属于非

激素类药物,主要用于治疗儿童及成人的支气管哮喘。ST 化学名为(*RS*)-(2-(4-(3-乙氧基-2-羟基丙氧基)苯基氨基甲酰)乙基)二甲基铈对甲苯磺酸盐,ST 及其内标结构式见图 1,根据结构式可知 ST 含有硫鎓离子,LC-MS/MS 在电喷雾正离子模式(ESI⁺)下信号响应强;为了提高 LC-MS/MS 定量的

作者简介: 杨再香,女,硕士 E-mail: 124394918@qq.com

*通信作者: 张宗平,男,博士 E-mail: zhangzongping@cqljpharma.com

准确性和精密度, 重庆柳江医药科技有限公司自行合成同位素内标(suplatast tosilate-D5, ST-D5), 其具有 5 个氘代氢, 与 ST 交叉分析干扰符合要求, 满足生物分析稳定性同位素内标的要求。

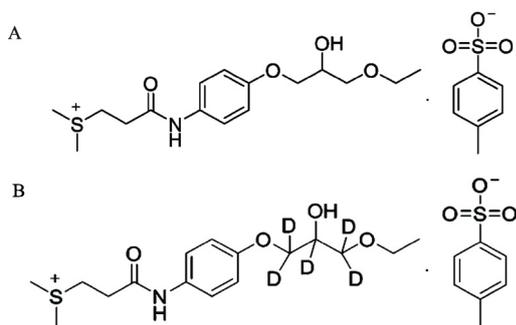


图 1 分子结构式
A-甲磺司特; B-甲磺司特-D5。

Fig. 1 Molecular structure
A-suplatast tosilate; B-suplatast tosilate-D5.

另外, 由于 ST 中含有酰胺结构, 且其氮原子连接在苯环上, 氮上电子被分散在芳香环上, 使得羰基碳原子带正电, 容易受到水解酶的亲核进攻, 提示 ST 可能在血浆或全血中不稳定。因此解决 ST 的稳定性问题是建立可靠的生物分析方法的基础。关于稳定性, 文献报道酯类前药以及含有酰胺、内酰胺、肽键及内酯的酶不稳定化合物, 可以通过控制温度、控制 pH(pH 4~5 或 0.5% 的甲酸、磷酸)、添加酶抑制剂或其组合达到抑制其水解的目的^[3-5]。

目前, 仅有个别文献报道了 ST 代谢物 M-1 在血浆中的测定^[6]。进行的大鼠动物实验表明一部分 ST 碱基在小肠腔中或者小肠壁上表现出首过效应, 被代谢成为 M-1。推测人也会有相同的首过效应, 但因为种属差异不确定其程度。对代谢物的药理作用进行探讨发现人血浆中已知代谢物 M-1 和 M-2 均有抑制白细胞介素-4 和组胺的活性作用^[1]。但 ST 仍是主要的活性成分, 在体内远高于 M-1 和 M-2 的浓度。因为原形药物的药时曲线比代谢产物能更灵敏地反映制剂间的差异, 因此生物等效性评价需要测定 ST 原形药物^[7]。

目前尚未见文献报道 ST 在血浆中含量检测的方法。考虑到低温、较低的 pH 均能在一定程度上抑制酶的活性, 同时可作为羧酸酯酶抑制剂的 NaF^[8-9]采血管已有市售品, 因此本研究旨在通过组合式抑制酶活性的手段达到稳定血浆及全血中 ST 的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC-30AD 超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); AB6500+三重四级杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司); MSA6.6S-OCE-DM 百万分之一天平(德国 Sartorius 公司); KH-500DB 数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器); VX-03 多管道涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司)。

1.2 药物与试剂

ST 对照品(植恩生物技术股份有限公司, 批号: DT19A-190301; 含量: 99.9%;); ST-D5 对照品(重庆柳江医药有限公司, 批号: A07-18052501B; 含量: 99.0%); 甲醇、乙腈、异丙醇为 HPLC 级, 均购自德国 Merck 公司; 乙酸铵(LC-MS 级, 美国 Thermo Fisher Scientific); 甲酸(HPLC 级, 阿拉丁试剂有限公司); 水(纯化水, 杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 液-质联用条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Polaris 3 Si-A (3.0 mm×100 mm, 3 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(A)-甲醇-乙腈溶液(1:1)(B), 流速 0.80 mL·min⁻¹, 以 50%B 等度洗脱 3.5 min; 柱温 40 °C; 进样盘温度 4 °C; 进样体积 10 μL。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾电离方式, 正离子模式下进行检测; 扫描方式: 多重反应监测; ST *m/z* 328.1→266.3, ST-D5(内标) *m/z* 333.1→271.3, 气帘气压力: 45 psi; 雾化气(GS1): 50 psi; 辅助气(GS2): 60 psi; 雾化气温度: 500 °C; 喷雾电压: 5 000 V。

1.4 对照品储备液及工作溶液制备

由 2 人分别精密称取 2 份 ST 对照品 2.544, 2.461 mg, 用乙腈分别溶解成 100 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。再分别用乙腈稀释成 5.00 μg·mL⁻¹ 的 2 份工作溶液, 一份用于配制校正标样, 一份用于配制质控样品。

1.5 校正标样和质控样品制备

空白人血浆加入适量工作溶液, 使人血浆中 ST 浓度为 200 ng·mL⁻¹, 之后再用人血浆逐级稀释成 150, 100, 75.0, 50.0, 25.0, 10.0, 5.00 和 1.00 ng·mL⁻¹ 的校正标样。以与校正标样相同的方式, 配制成 1.00, 3.00, 20.0, 80.0, 160 ng·mL⁻¹ 的质控样品。

1.6 血浆样品前处理

在塑料(EP)管中加入标准曲线样品、质控样

品、双空白样品、空白样品、试验样品 20 μL 。在除双空白样品外的其余样品中加入 200 μL 的内标工作溶液(10.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 溶剂: 乙腈), 在双空白样品中加入 200 μL 内标替代液(乙腈), 在批量涡旋仪上涡旋 3 min 使其充分混匀。在 0 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的离心机上 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 4 min, 取上清 20 μL , 加入 300 μL 50% 的乙腈水溶液、混匀。将样品加入 96 孔板, 通过 LC-MS/MS 检测。前处理环境条件为冰浴、白光。

1.7 方法开发

1.7.1 色谱条件的选择 先尝试在反相 C_{18} 色谱柱上进行分离, 由于 ST 含有硫鎇离子以及酰胺极性较强, 反相系统上不易保留, 需要极高的水相比。但在增加保留的同时, 也造成了 ST 的拖尾及残留。鉴于反相系统上峰形、保留和残留的局限性, 进而对正相系统进行考察。通常, 正相系统的优势在于与反相系统的保留造成互补, 且高有机相比例对应的柱压低、待测物响应高, 耐受高有机相复溶剂和高流速等因素均利于解决峰形、残留和样品处理及复溶等诸多问题。本研究对比了不同规格及厂家的正相色谱柱, ST 在正相色谱柱上峰形对称, 有较强的保留且无残留。

1.7.2 稳定性的评估及解决方案 为较快地评估 ST 在血浆中降解的程度, 首先, 比较了冰浴及室温条件下用含 EDTA 抗凝剂的血浆配制的质控样品 24 h 内的响应变化, 结果见图 2A。在冰浴和室温条件下, 以 EDTA 抗凝剂时, ST 7 h 降解率分别约为 25%, 50%, 24 h 降解率分别约为 60%, 80%。因而, 降低温度对降解有一定抑制作用, 但仍然有明显的降解。然后, 考察在冰浴条件下用含 NaF/EDTA 抗凝剂的血浆配制的质控样品 6 h 内的响应变化。结果见图 2B。冰浴操作条件下, 以 NaF/EDTA 作抗凝剂时, ST 6 h 降解率约为 6% 且 5~6 h 趋于稳定, 稳定性有较明显的改善。继而, 对含 NaF/EDTA 抗凝剂的血浆质控样品进行冻融、长期稳定性考察。其中 -70°C 条件下, 4 次冻融及储存 3 个月后稳定性基本符合要求; 但在 -20°C 储存条件下, 3 个月 ST 降幅较大, 超出稳定性要求, 结果见图 3。鉴于在 -20°C 储存条件下, 含 NaF/EDTA 抗凝剂的血浆质控样品 ST 依然有稳定性问题, 进一步考察了在血浆中分别加入占血浆体积比为 1% 的三氟乙酸、占血浆体积比为 2% 的甲酸时, ST 响应的变化, 测试知 3 h 内在冰浴下, ST 响应

没有明显变化但较高比例的酸使得血浆较黏稠, 不易移取, 拟选择占血浆体积比为 0.5% 的甲酸^[4]。

综上研究数据可知, 低温、抗凝剂 NaF/EDTA、较低 pH 均起到抑制降解的作用。综合考虑, 拟选择低温(冰浴下前处理、 -70°C 储存)、抗凝剂 NaF/EDTA 及占血浆体积比为 0.5% 的甲酸作为稳定措施。

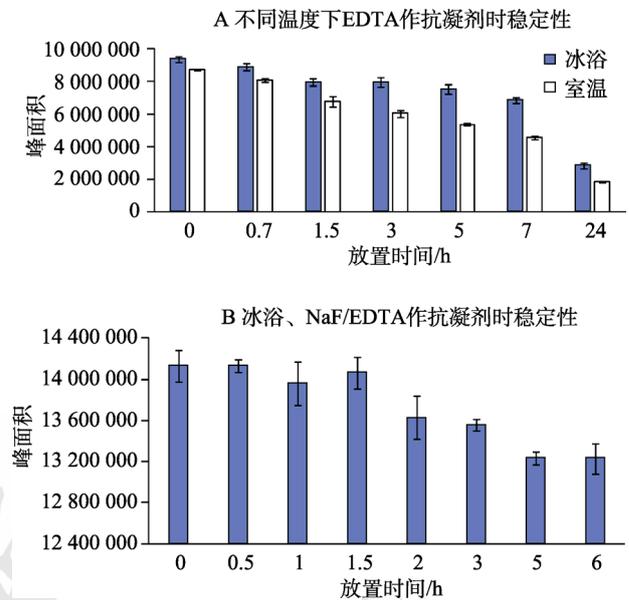


图 2 不同温度、不同抗凝剂下前处理过程中甲磺司特的稳定性考察

Fig. 2 Study on the stability of suplastat tosilate during pretreatment with different temperatures and different anticoagulants

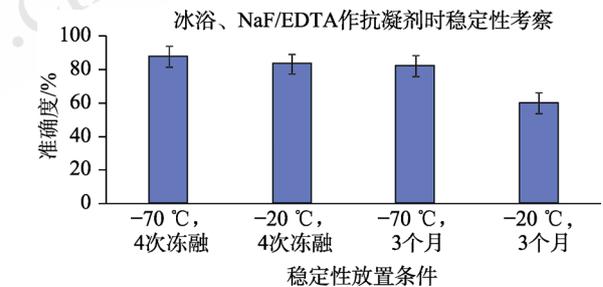


图 3 冰浴、NaF/EDTA 作抗凝剂时甲磺司特的稳定性考察

Fig. 3 Study on the stability of suplastat tosilate in ice bath and NaF/EDTA as anticoagulant

1.7.3 前处理方法的选择 生物样品前处理的方法常见有液液萃取、蛋白沉淀及固相萃取。由于 ST 含有硫鎇离子以及酰胺, 极性较强。在弱碱下并不能使 ST 完全非离子化, 同时易造成 ST 不稳定, 因此液液萃取回收率低; 固相萃取阳离子模式虽易锁定 ST 硫鎇离子, 但不易洗脱; 固相萃取反向或混合模式 ST 可以保留, 但较难于洗脱, 且

碱性的洗脱液也会带来不稳定。由于 ST 硫鎓离子自身带电及 HPLC 正相系统的高有机相均提高了方法的灵敏度,这使得蛋白沉淀的选择成为可能,因为可以进行多倍稀释以克服蛋白沉淀、正相系统可能带来的严重基质效应。

1.8 方法学验证

本验证依据中国药典 2020 版四部 9012^[10],及 2018 年 FDA 生物样品定量分析方法验证指导原则^[11]进行。

1.8.1 选择性考察 用 8 批来自不同供体的空白基质,其中 6 个为单个进口的人血浆,2 个为单个国内的人血浆。用 8 批血浆分别配制成定量下限(lower limit of quantitation, LLOQ)浓度($1.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)水平的样品,平行配制 3 份,考察专属性;用 8 批血浆分别配制成基质双空白、基质空白(含工作浓度水平内标)用于考察一般选择性;用混合基质配制成含定量上限(upper limit of quantitation, ULOQ)的分析物及混合基质空白来考察交叉分析干扰。

1.8.2 残留考察 在 ULOQ 校正标样($200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)后立即进样 2 份空白基质样品,与同分析批的 2 份 LLOQ 校正标样与 6 份 LLOQ 浓度质控样品进行评估,需至少选择 3 个验证批进行验证。

1.8.3 批内精密度和准确度 在国外空白人血浆中加入适量工作溶液,使人血浆中 ST 浓度为 $160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,之后再用人血浆逐级稀释成 $80.0, 20.0, 3.00, 1.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高、中、低及 LLOQ 质控样品,其中中浓度质控样品包括 $80.0, 20.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个质控浓度至少 6 份样品。

1.8.4 批间精密度和准确度 参考“1.8.3”项,在不同天用国外空白人血浆配制成 $1.00, 3.00, 20.0, 80.0$ 和 $160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品,其中中浓度质控样品包括 $80.0, 20.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个质控浓度至少 6 份样品。

1.8.5 耐用性 参考“1.8.3”项,由不同人用国外空白人血浆配制成 $1.00, 3.00, 20.0, 80.0$ 和 $160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品,其中中浓度质控样品包括 $80.0, 20.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个质控浓度至少 6 份样品。

1.8.6 桥接的精密度和准确度 参考“1.8.3”项,使用混合的国内血浆,配制成 $3.00, 20.0, 80.0$ 和 $160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品,其中中浓度质控样品包括 $80.0, 20.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个质控浓度至少 6 份样品。

1.8.7 回收率试验 提取后的待测物(或内标物)样品:将待测物以 $3.00, 20.0, 80.0$ 和 $160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 加至空白基质中(内标物以恒定浓度加入)的样品按常规方法进行前处理;未提取的待测物(或内标物)样品:将空白基质按常规方法前处理后再加入低、中、高质控进样浓度的待测物(内标物以恒定浓度加入);平行制备至少 6 份样品。

1.8.8 基质效应 用空白基质,至少来自不同供体的 10 个批次,其中 6 个为正常批次(4 个进口的人血浆,2 个国内的人血浆),2 个为溶血批次(5%溶血),2 个为脂质批次和纯溶剂经前处理后,分别制备低、中、高质控样品进样浓度水平的样品各 1 份。

1.8.9 溶血和高脂血浆的准确度和精密度考察 用 5%溶血血浆和高脂血浆配制成 $3.00, 160 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、高浓度质控样品。

1.8.10 稀释可靠性考察 对于浓度过高的样品(高于 ULOQ)稀释:用超过 ULOQ 浓度的质控样品 10 倍稀释进样,平行制备至少 6 份样品。

1.8.11 稳定性考察 从全血采集、前处理到样品进样完成,对涉及的全血稳定性、待测物储备液的室温及长期稳定性、质控样品长期及冻融稳定性、进样重现性、进样盘中的稳定性进行考察。

2 方法学验证结果

2.1 选择性考察

8 份不同来源基质配制的 LLOQ 浓度的最大偏差为 -4.94% ;8 份不同来源的空白基质中,待测物处的最大背景干扰为 25.0% ,内标物处未检测到背景干扰;混合基质空白中,待测物处未检测到背景干扰;在 ULOQ 浓度不加内标的样品中,内标物处未检测到背景干扰。结果见图 4。

2.2 残留考察

待测物残留的最大百分比为 5.5% 。

2.3 批内、批间精密度和准确度、耐用性、桥接精密度和准确度

LLOQ 精密度 RSD 最大值为 4.63% ,准确度偏差最大为 -4.40% ;批内低、中、高浓度质控样品 RSD 最大值为 9.10% ,准确度偏差最大为 8.00% 。结果见表 1,标准曲线拟合系数 r 为 0.9998 。

2.4 回收率

ST 低、中、高浓度水平的平均回收率均值为 112.8% ,RSD 为 6.29% 。ST-D5 回收率均值为 105.5% ,RSD 为 4.10% 。结果见表 2。

表 1 精密度和准确度考察结果

Tab. 1 Test results of precision and accuracy

项目	浓度水平	甲磺司特	
		准确度偏差范围/%	最大 RSD/%
批内	LLOQ	-4.40~1.00	4.57
	低/中/高质控	-4.33~8.00	9.10
批间	LLOQ	-0.90	4.52
	低/中/高质控	0.00~5.00	7.66
桥接	低/中/高质控	-1.00~3.13	1.90
	LLOQ	-2.00	4.63
耐用性	LLOQ	-2.67~3.75	2.74
	低/中/高质控	-2.67~3.75	2.74

注: 包含批内、批间精密度和准确度, 耐用性, 桥接的精密度和准确度。
Note: Intra-assay and inter-assay precision and accuracy, robustness and bridged intra-assay precision and accuracy were included.

表 2 回收率

Tab. 2 Rate of recovery

项目	甲磺司特回收率均值/%	甲磺司特-D5 回收率均值/%
低浓度质控	110.9	105.3
中浓度质控	117.1	106.3
高浓度质控	110.3	105.0
均值	112.8	105.5
RSD/%	6.29	4.10

2.5 基质效应

不同来源的 10 份基质(4 份正常进口血浆、2 份溶血进口血浆、2 份脂血进口血浆、2 份正常国内血

浆)的内标归一化基质因子的 RSD 最大为 1.98%。

2.6 溶血和高脂血浆的准确度和精密度

5%的溶血血浆配制的低、高浓度质控样品的准确度偏差范围为 -4.67%~-2.50%, RSD 为 1.43%; 高脂血浆配制的低、高浓度质控样品的准确度偏差范围为 -6.67%~0.63%, RSD 为 3.38%。结果见表 3。

表 3 溶血及高脂血浆的精密度和准确度

Tab. 3 Precision and accuracy of hemolytic and lipemia plasma

血浆种类	浓度水平	甲磺司特	
		准确度偏差范围/%	RSD/%
5%溶血	低/高质控	-4.67~2.50	1.43
高脂	低/高质控	-6.67~0.63	3.38

2.7 稀释可靠性

待测物 10 倍稀释的准确度偏差最大为 5.44%, RSD 为 2.12%。

2.8 稳定性

待测物从采集至进样完成的过程, 稳定性符合要求。结果见表 4。

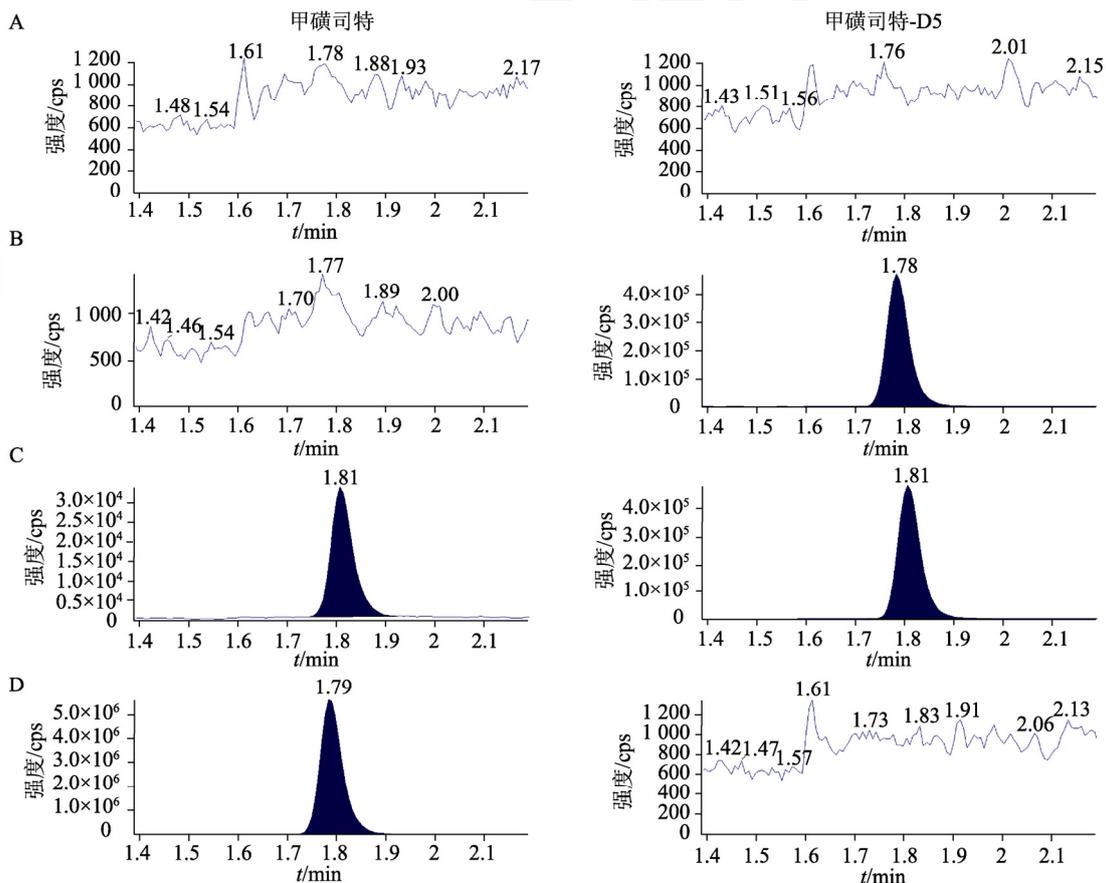


图 4 测定血浆中甲磺司特及内标甲磺司特-D5 的典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+内标甲磺司特-D5; C-定量下限; D-空白血浆+定量上限甲磺司特。

Fig. 4 Typical chromatograms of ST and internal standard suplatost tosilate-D5 in plasma

A-blank plasma; B-blank plasma+internal standard suplatost tosilate-D5; C-lower limit of quantitation; D-blank plasma+upper limit of quantitation ST.

表 4 稳定性结果

Tab. 4 Results of stability

稳定性类型	稳定条件	甲磺司特准确度偏差/%
全血	冰浴 2 h	-1.62~0.08
贮备液室温	室温 24 h	1.59
贮备液长期	-20 °C, 210 d	2.22
长期	-20 °C, 205 d	2.67~10.63
	-70 °C, 205 d	1.00~10.00
冻融	-20 °C, 4 次	-2.00~2.50
	-70 °C, 4 次	1.33~4.38
进样重现性	4 °C, 48 h	-
进样盘中放置	4 °C, 77 h	-5.50~2.83

注：进样重现性需要满足初始分析批的标准。

Note: Reinjection reproducibility need to meet the run acceptance criteria of the original injection.

综上所述，方法学验证符合现行中国药典 2020 年版 9012 及 2018 版 FDA 生物样品定量分析方法验证指导原则的要求。

3 讨论

本研究建立了一种稳定的定量分析人血浆中 ST 的 LC-MS/MS 方法,其 LLOQ 为 1.00 ng·mL⁻¹, ULOQ 为 200 ng·mL⁻¹。全血采集在冰浴下进行,采用 NaF/EDTA 采血管,分离出的血浆中加入占血浆体积比为 0.5%的甲酸。采用简便的蛋白沉淀法^[12-13]对血浆样品进行预处理,血浆用量极小,无残留^[14];方法用国外血浆进行全验证、同时使用国内血浆进行桥接验证^[10-11],适于 ST 颗粒的生物等效性研究。

该方法的关键之一在于稳定性问题的解决。方法开发期间,常温、以 EDTA 为抗凝剂质控样品经历 1 次冻融后,低、高质控样品的准确度偏差均在-20%左右;随冻融次数增加,ST 降低加剧。根据该实验现象结合理论分析推测 ST 生物不稳定的原因可能是:ST 中的酰胺键容易受到酯酶尤其是胆碱酯酶或酰胺酶的作用被水解。以降低酶活性为目的,对比温度、抗凝剂及 pH 的不同组合方式知仅在这 3 种手段同时作用时,才能完全解决 ST 的稳定性问题。另外,毒扁豆碱因其对酯酶^[4,15]特异性强,也可考虑使用。

另外一个关键点是,ST 硫鎓离子部分带正电极性大,同时也含有脂肪长链,因此其在反相色谱系统上保留弱且拖尾,容易带来残留。而残留是生物分析工作中面临的普遍且棘手的问题^[14,16]。本研究开发了正相色谱系统,发现多种正相色谱柱上峰形、残留均符合生物分析方法学验证的要求。

样品处理方面,综合分析了现有前处理方法针对 ST 提取的利弊。选择了简便的蛋白沉淀法,达到了多倍稀释、降低基质效应的目的。

同时,需要注意的是 ST 对照品的临界相对湿度是 65%、相对湿度低于该值时基本认为不具有吸湿性,高于该值时其吸湿性急剧增加。因而要求称量环境的相对湿度应 ≤ 60%。

最后,本研究也为使用不同国别的血浆时,进行桥接或部分验证所需进行的具体补充验证提供了参考。

REFERENCES

- [1] 日本大鵬药品工业株式会社. 甲磺司特颗粒 IF. 2009. 11.
- [2] YANAGIHARA Y, KINIWA M, IKIZAWA K, et al. Suppression of IgE production by IPD-1151T(suplatast tosilate), a new dimethylsulfonium agent: (1). Regulation of murine IgE response[J]. Jpn J Pharmacol, 1993, 61(1): 23-30.
- [3] SØRENSEN L K, HASSELSTRØM J B, GUNST J D, et al. Determination of camostat and its metabolites in human plasma-Preservation of samples and quantification by a validated UHPLC-MS/MS method[J]. Clin Biochem, 2021(96): 56-62.
- [4] LI W, FU Y, FLARAKOS J, et al. Handbook of LC-MS bioanalysis: Best practices, experimental protocols, and regulations[M]. John Wiley & Sons Inc, 2013.
- [5] PEREZ H L, KNECHT D, BUSZ M. Overcoming challenges associated with the bioanalysis of an ester prodrug and its active acid metabolite[J]. Bioanalysis, 2017, 9(20): 1589-1601.
- [6] DING L, DING L K, ZHOU X, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of the active metabolite M-1 of suplatast tosilate in human plasma[J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21(12): 1297-1302.
- [7] 中国国家药品监督管理局. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则[S]. 2016.
- [8] HAHNEFELD L, GURKE R, THOMAS D, et al. Implementation of lipidomics in clinical routine: Can fluoride/citrate blood sampling tubes improve preanalytical stability?[J]. Talanta, 2020(209): 120593.
- [9] KROMDIJK W, ROSING H, VAN DEN BROEK M P, et al. Quantitative determination of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in human fluoride EDTA plasma including the *ex vivo* stability using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012(891/892): 57-63.
- [10] 中国药典. 四部[S]. 2020.
- [11] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry[S]. FDA, CDER, CVM. 2018-05.
- [12] GUO J J, CHEN B, CHEN B, et al. Determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS and its application[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(1): 63-70.
- [13] YANG X P, ZOU S L, JIANG Y, et al. Simultaneous determination of concentration of six antifungal drugs in human plasma by LC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(17): 2093-2099.
- [14] WILLIAMS J S, DONAHUE S H, GAO H, et al. Universal LC-MS method for minimized carryover in a discovery bioanalytical setting[J]. Bioanalysis, 2012, 4(9): 1025-1037.
- [15] 顾俊, 高书林, 谈伟锋. 水杨酸毒扁豆碱在含酯键药物体内药物分析中的用途: 中国, 112326905B[P]. 2021-04-06.
- [16] YAMAGAKI T, YAMAZAKI T. Troubleshooting carry-over in the LC-MS analysis of biomolecules: The case of neuropeptide Y[J]. Mass Spectrom (Tokyo), 2019, 8(2): S0083.

收稿日期: 2021-02-18

(本文责编: 沈倩)